

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09275849  
PUBLICATION DATE : 28-10-97

APPLICATION DATE : 17-04-96  
APPLICATION NUMBER : 08095178

APPLICANT : EISAI CO LTD;

INVENTOR : MURAMATSU TATSUO;

INT.CL. : A01K 67/027 C12N 15/09

TITLE : EGG-LAYING HEN HAVING MUCOUS MEMBRANE OF FALLOPIAN TUBE  
TRANSDUCED WITH EXOGENEOUS GENE

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject egg-laying hen expected to be a new system for producing the objective gene product as a form of a recombinant protein in its egg because of expressing the objective protein in mucous membrane of its fallopian tube by transducing an exogeneous gene into the ampullar part of mucous membrane of the fallopian tube.

SOLUTION: This egg-laying hen is obtained by transducing an exogeneous gene into the ampullar part of mucous membrane of the fallopian tube. A firefly luciferase gene, a human erythropoietin gene, etc., are exemplified as the exogeneous genes. The transduction of the exogeneous gene is performed by integrating the gene into an expression vector, constructing a plasmid having the gene and transducing the plasmid by an electroporation method. Concretely, a 17 month-old egg-laying hen is anesthetized with an ether and operated for exposing the fallopian tube. Further, the above plasmid is injected into the fallopian tube, the fallopian tube is treated with an electric pulse and thereby the exogeneous gene is transduced into the mucous membrane.

COPYRIGHT: (C) JPO

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-275849

(43) 公開日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 K 67/027			A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-95178

(22) 出願日 平成8年(1996)4月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年10月25日  
日本家禽学会発行の「日本家禽学会誌第32巻秋季大会  
号」に発表

(71) 出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72) 発明者 朴 熙万

愛知県名古屋市南区星崎1-223

(72) 発明者 今井 崇

愛知県名古屋市緑区神沢1-1210

(72) 発明者 落合 浩史

愛知県尾西市玉野字上新田32-38

(72) 発明者 奥村 純市

愛知県名古屋市南区殿町1-3

(72) 発明者 村松 達夫

愛知県豊橋市大岩町字北田45

(74) 代理人 弁理士 古谷 馨 (外3名)

(54) 【発明の名称】 卵管粘膜に外来遺伝子を導入した産卵鶏

(57) 【要約】

【課題】 輸卵管膨大部粘膜に外来遺伝子を導入し発現させた産卵鶏を提供することにある。

【解決手段】 目的とする外来遺伝子を発現性ベクターに組み込み、輸卵管膨大部粘膜にエレクトロポレーション法により導入することにより、目的遺伝子が粘膜内で発現していることを確認した。

【効果】 卵内で目的とする遺伝子産物を組換えたんぱく質の形で作らせる新しい生産システムとして期待される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ニワトリの輸卵管膨大部粘膜に外来遺伝子を導入した産卵鶏。

【請求項2】 ニワトリの輸卵管膨大部粘膜に外来遺伝子をエレクトロポレーション法により導入した請求項1に記載の産卵鶏。

【請求項3】 外来遺伝子がエリスロポエチン遺伝子である請求項1又は2に記載の産卵鶏。

【請求項4】 外来遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項1又は2に記載の産卵鶏。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はニワトリの輸卵管膨大部粘膜に目的とする蛋白質の遺伝子を導入、発現させた産卵鶏に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トランスジェニックバード、とくにニワトリへの遺伝子導入法については、基礎研究、産業への応用の両面において、強くその技術の確立が要求されている。現在、マウス、ウシなどで盛んにトランスジェニック個体が作られ、研究用や微量成分生産用に利用されている。一方、ニワトリに関しては、1986年Salterらが(Salter, D.W. et al., Poultry Sci., 65, 1445-1458, 1986)レトロウイルスベクターを用いてトランスジェニックニワトリの作成を報告したが、この方法には多くの問題点が存在することが指摘され、より安全で確実な遺伝子導入法の開発がこれまでいろいろと試みられてきた。受精卵へのマイクロインジェクション、胚盤葉細胞へのトランスフェクションやレトロウイルスを用いる方法、始原生殖細胞への遺伝子導入など、非常に多くの方法が試みられているが染色体へのインテグレーション頻度の問題や安全性の問題など克服しなければならない問題点が多くいまだ成功に至っていない。

【0003】トランスジェニックニワトリ作成の目的のひとつに、卵は非常に高濃度の蛋白質を蓄積することから、卵内で目的とする遺伝子産物を組み換え蛋白質の形で作らせ、毎日産み落とされる卵を回収するだけで、例えば貴重な医薬品などを大量に生産できる新しい生産システムが可能となる。しかしながらいまだ成功していない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、輸卵管膨大部粘膜に外来遺伝子を導入し発現させた産卵鶏を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】卵巣から排卵された卵子は卵管に取り込まれ、卵管膨大部で卵白の形成がなされる。本発明者らは目的とする外来遺伝子を膨大部粘膜内にエレクトロポレーション法により導入することを鋭意研究し、目的遺伝子が粘膜内に導入され、目的蛋白質

が発現していることを確認し本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち本発明は、ニワトリの輸卵管膨大部粘膜に外来遺伝子を組み込んだ産卵鶏であって、目的外来遺伝子がエリスロポエチン遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子である産卵鶏に関する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

10 【0008】外来遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子、ヒトエリスロポエチン遺伝子など目的とする蛋白質の遺伝子を選択し、常法に従い、発現ベクターに組み込む。例えば、目的遺伝子をその発現に適したベクターのプロモーター下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いる公知の方法により再結合して組み換え発現ベクターを作成することができる。ベクターとしては、例えば pBR 322 にSV40の oriの挿入されたpSV2-X, pcD-X などが掲げられるが、特に限定されない。プロモーター、シグナル配列およびターミネーターに関しても粘膜での導入遺伝子の発現に適したものであれば特に限定されず、プロモーターとしてはSV40由来のプロモーター、レトロウイルス由来のプロモーターあるいはニワトリ自身の遺伝子

20 のプロモーターなどが掲げられる。このようにして構築された、目的遺伝子を保持するプラスミドはエレクトロポレーション法 (Tur-Kaspa, R. et al., Molecular and Cellular Biology, 6, 716-718, 1986)によりニワトリ輸卵管膨大部粘膜に導入することができる。

30 【0009】17ヶ月齢の産卵鶏をエーテル麻酔下、手術により卵管を露出し、プラスミドを注射後、電気パルス処理して粘膜内へ導入することができる。粘膜に保持されたことの確認は、トランスフェクションの24時間後、粘膜を摘出し、その粘膜組織を培養した上澄液または粘膜組織ホモジナイズ抽出液を分離調製し、目的蛋白質が発現しているか否かを定量する。定量法は目的蛋白質に応じて通常の蛋白質定量法を適用すればよく、例えば抗体を用いる ELISA法などを採用することができる。

## 【0010】

40 【実施例】以下の実施例により本発明を詳細かつ具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0011】実施例1：ニワトリ輸卵管膨大部粘膜へのプラスミドの導入

外来遺伝子として、ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびヒトエリスロポエチン遺伝子を選択した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子をプラスミド pSV $\beta$ Gal のHindIIIと BamHI部位に挿入し、該遺伝子の上流にウシ $\alpha$ -ラクトアルブミンのシグナルペプチドをコードするDNA配列を付加し分泌機能を持たせたプラスミド (pSVsec1uc), および分泌機能を持たないプラスミド (pSV1uc) を作製した。両プラスミドともプロモーターにはSV40を用いた

(図1)。ヒトエリスロポエチン遺伝子を含むプラスミドも同様に作製し、この場合プロモーターを三種類変えたもの、すなわちSV40(pSVhEPX)、ニワトリOvalbumin promoter-1350領域(pOVEP0-1.35)、およびMiw promoter(pMiwEP0)を用いた(図2)。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpMiwLucを作製し、エリスロポエチンプラスミドと卵管粘膜へ共導入した。17ヶ月齢の産卵鶏(産卵率約70%)をエーテル麻酔下、卵管を手術により露出し、膨大部粘膜へプラスミドDNAを注射後

#### 【0012】実施例2：発現蛋白質の確認

in vivo トランスフェクションの24時間後に産卵鶏を屠殺し、遺伝子導入した粘膜部位を取り出した。ルシフェラーゼを遺伝子導入した場合は、摘出した組織を37℃の生理食塩水溶液中で1時間培養し、培養液を回収した。組織は再び新鮮な37℃の生理食塩水に移し、回収液及び組織を生物発光分析に供した。ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入した場合は、取り出した卵管組織はただちにホ

モジナイズした。そのホモジネートを超音波破碎した後、遠心分離をして細胞内蛋白質を抽出してエリスロポエチンの定量に供した。

【0013】組織及び培養液の生物発光像はSingle photon imaging system (浜松ホトニクス) によって得た。

抽出液中の蛋白質含量はBCA Protein Reagent(Pierce \*

\*社)キットによって測定し、ホタルルシフェラーゼ活性はルミノメーターによって測定した。ヒトエリスロポエチンはELISA法により測定した。

【0014】ルシフェラーゼ遺伝子導入の結果は、図4に、pSVsecluc、pSVlucまたはpSVGalを導入した組織片及び培養液の光学イメージ、生物発光イメージならびに両者の重複イメージ画像で示した。発光イメージから明らかなように、シグナル配列を持ったpSVseclucでは組織の回りにも弱い発光が見られ、さらに培養液のみに

も発光が観察された。これに対し、シグナル配列を持たないpSVlucでは、発光像は組織部分に集中しており、培養液中には発光は見られなかった。また、negative controlとしてのpSVGalや無処理の組織及び培養液では発光はまったく観察されなかった。したがって、生態卵管への遺伝子導入によって発現蛋白質を検出することのみならず、分泌させることも可能であることが判明した。

#### 【0015】エリスロポエチン遺伝子導入の結果として

表1に、エリスロポエチン濃度と、共導入したルシフェラーゼ活性を併せて示した。エリスロポエチン濃度は低いながらもpMiwEP0 およびpOVEP0-1.35 でそれぞれ5.0

および0.8mU/ml 検出された。また同時に導入したルシフェラーゼ活性も、エリスロポエチン濃度とほぼ比例した値が得られた。

#### 【0016】

【表1】

導入プラスミド	エリスロポエチン (mU/ml cell extract)	ルシフェラーゼ活性 (light U/5mg protein)
None	N.D.	—
pOVEP0-1.35+pMiwLuc	0.8	18.1
pSVhEPX+pMiwLuc	N.D.	0.6
pMiwEP0+pMiwLuc	5.0	114.6

【0017】以上の結果より、産卵鶏の卵管においてin vivo の状態で導入したホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現と発現産物分泌、ならびにエリスロポエチンの生産が可能であることが判明した。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 ルシフェラーゼ遺伝子挿入プラスミドを示す図である。

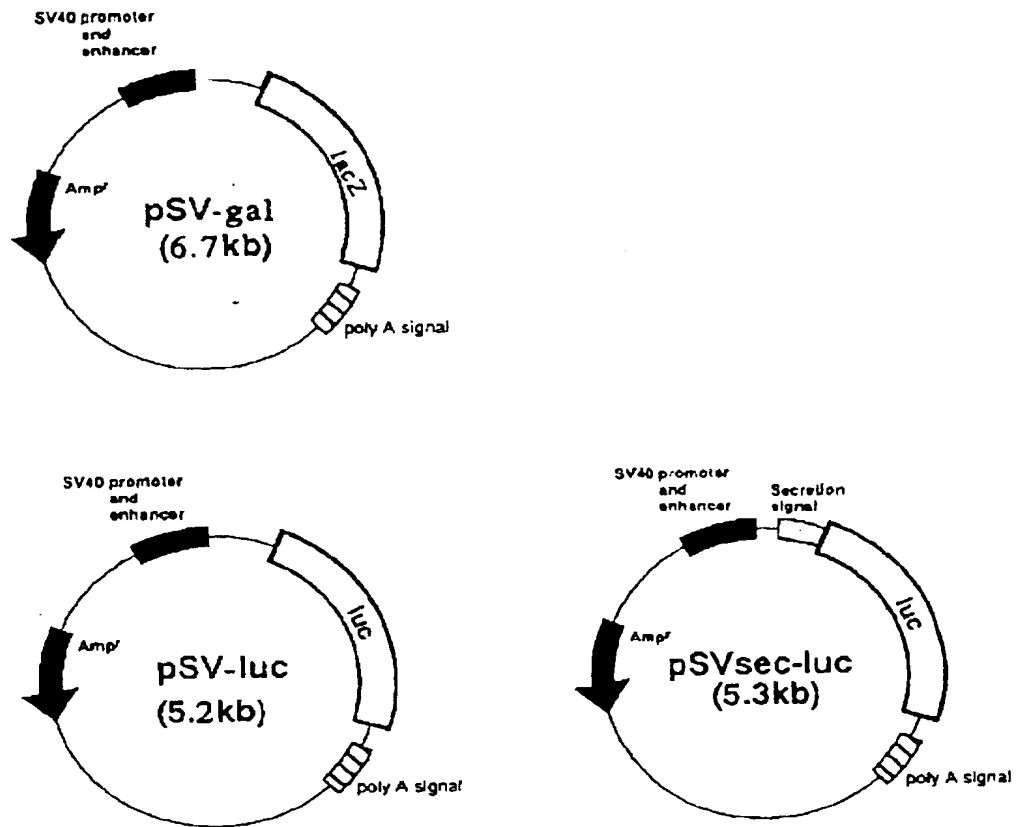
※

※【図2】 エリスロポエチン遺伝子挿入プラスミドを示す図である。

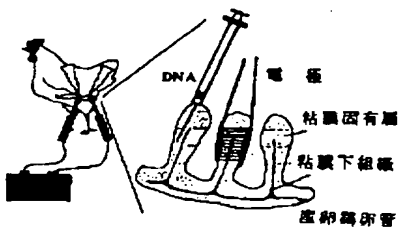
【図3】 エレクトロポレーション法による粘膜への遺伝子導入を説明する図である。

40 【図4】 ルシフェラーゼ遺伝子導入粘膜の光学イメージを示す図である。

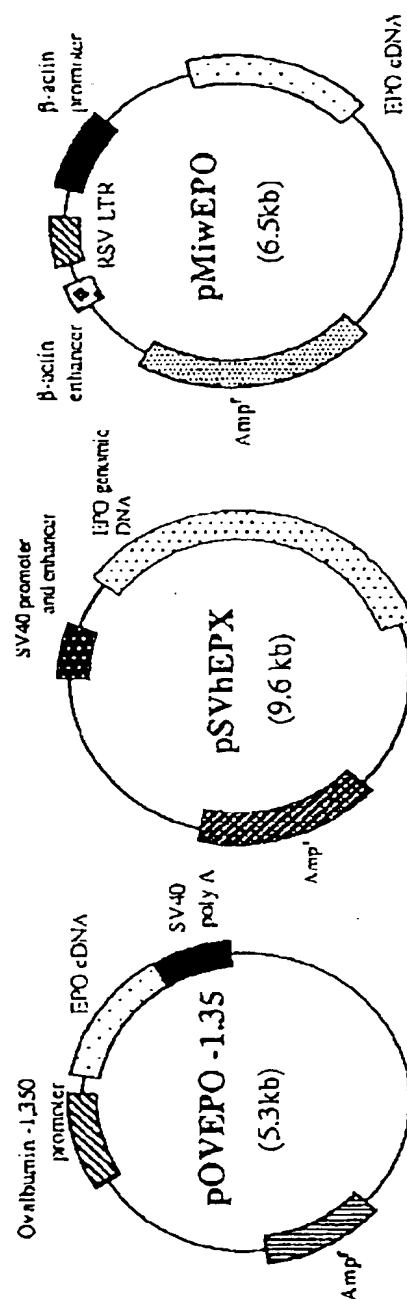
【図1】



【図3】



【図2】



【図4】

